

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 347-350

Clinical Evaluation of Two Calculation Methods for a Free Thyroxine Assay

By A. J. Bakker and Ina Terpstra

Clinical Chemistry Laboratory (Director: Dr. P. C. van der Schaaf) Leeuwarden, The Netherlands

(Received June 12/December 1, 1980)

Summary: A commercial assay for the measurement of the free thyroxine concentration in serum has been subjected to a change of method of calculation, together with a change of antibody. The clinical significance of both methods of calculation, before and after the change of antibody, has been investigated.

Before the change of antibody the results of the original method of calculation were in slightly better agreement with the clinical data. After the change of antibody the results of the modified method of calculation were in better agreement with the clinical data.

Klinische Bewertung von zwei Berechnungsmethoden für eine Bestimmung des freien Thyroxins

Zusammenfassung: Eine käufliche Bestimmungsmethode für freies Thyroxin im Serum wurde hinsichtlich des Berechnungsmodus sowie des verwendeten Antikörpers modifiziert. Die klinische Bedeutung beider Berechnungsmethoden vor und nach Wechsel des Antikörpers wurde geprüft.

Vor dem Wechsel des Antikörpers stimmten die Ergebnisse der Originalmethode der Berechnung geringfügig besser mit den klinischen Daten überein. Nach dem Wechsel des Antikörpers stimmten die Ergebnisse der modifizierten Berechnungsmethode besser mit den klinischen Daten überein.

Introduction

The amount of free thyroxine (T_4) in serum is usually determined by cumbersome methods involving time-consuming equilibrium dialysis (1-4), so these methods are not in common use for the routine evaluation of thyroid function.

The recently introduced commercial kits for free T_4 determination lack these disadvantages, so they can be used for routine purposes.

One of these commercial kits for free T_4 determination has been subjected to a change of antibody as well as to a change of method of calculation. We have been evaluating the clinical consequences of both methods of calculation before and after the change of antibody.

Materials and Methods

Samples

All sera were stored at -20°C prior to assay. Specimens were thawed and allowed to reach room temperature before analysis.

Procedures

The free T_4 -immophase kinetic assay, which was used, was obtained from Corning Medical (Medfield, U.S.A.).

This is a two-tube assay. An amount of radiolabelled T_4 is added to the sample, and after a period of equilibration, a solid phase antibody is added and incubated for thirty minutes. The radioactivity bound to the solid phase antibody is measured. In the A series tube the rate of binding measured depends on the amount of free T_4 .

In the B series tube the rate of binding measured depends on the amount of total T_4 , because previous added thimerosal liberates T_4 from its binding proteins.

In the original method of calculation the so-called relative rate %

$$\left(= \frac{\text{cpm bound tube A}}{\text{cpm bound tube B}} \times 100\% \right)$$

is a function of free T_4 .

In the modified method of calculation, calculation of free T_4 depends on the prior calculation of total T_4 . Total T_4 can be calculated because the fraction bound in the B series

$$\left(= \frac{\text{cpm bound tube B}}{\text{total counts B}} \right)$$

is a function of total T_4 .

Free T_4 can then be calculated because the product of total T_4 and the fraction bound in the A series

$$\left(= \frac{\text{cpm bound tube A}}{\text{total counts A}} \right)$$

is a function of free T_4 .

Before the antibody was changed serum samples from 88 blood donors and 145 unselected patients were examined. After the change of antibody, serum samples from 155 blood donors, 225 unselected patients and 95 pregnant euthyroid women were evaluated. The "assay data" of both methods of calculation before and after the change of antibody were compared by using the least-squares method (5).

Results

Precision

The day-to-day variability of the assay for free T_4 both before and after the change of antibody has been considered. The influence of the method of calculation on the day-to-day variability of the assay for free T_4 has also been evaluated. The results shown in table 1 were obtained in the routine use of this assay for free T_4 .

Tab. 1. Influence of the method of calculation on the day-to-day variability of the assay for free T_4 before and after a change of antibody. The mean (\bar{x}) and the standard deviation (s) are expressed in pmol/l.

FT₄oc = original method of calculation for free T_4 .

FT₄nc = modified method of calculation for free T_4 .

Ref. 1 = reference control serum 1, supplied by Corning medical, Medfield, U.S.A.

NMS 1/IIA = control sera 1 and IIA, supplied by Nuclear Medical Systems Inc., Newport Beach, U.S.A.

Method of Anti- body	calcu- lation	Control	N	Free thyroxine \bar{x} (pmol/l)	s (pmol/l)	CV (%)
Original	FT ₄ oc	Ref. 1	22	19.05	1.03	5.4
		NMS IIA	22	37.07	2.19	5.9
	FT ₄ nc	Ref. 1	22	22.14	1.16	5.2
		NMS IIA	22	42.34	2.44	5.8
Changed	FT ₄ oc	Ref. 1	23	19.18	1.29	6.7
		NMS 1	23	38.48	5.02	13.0
	FT ₄ nc	Ref. 1	23	20.59	0.90	4.4
		NMS 1	23	32.43	2.70	8.3

Comparison of the "assay data" of both methods of calculation for free T_4

Before the change of antibody, comparison of the values for free T_4 by both methods of calculation showed a good correlation, as shown in figure 1.

After the change of antibody, the values for free T_4 by both methods showed a bad correlation. This is shown in figure 2.

Reference values

In order to establish the clinical significance of the changes, it is necessary to obtain reference values for the free T_4 for both methods of calculation, both before and after the change of antibody.

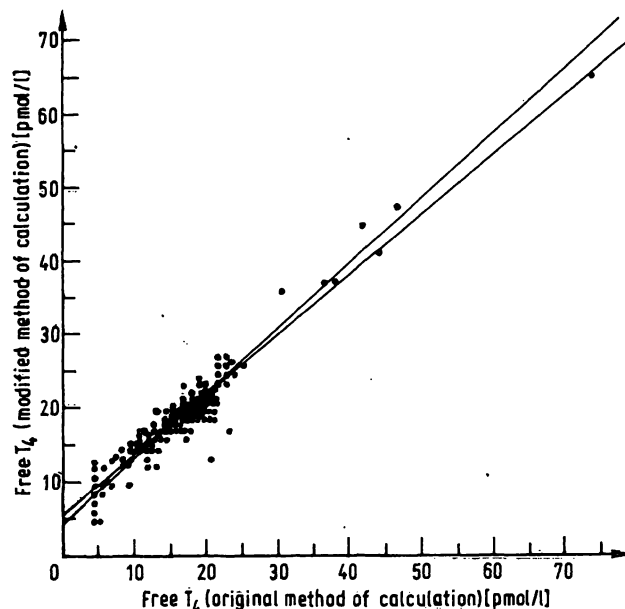


Fig. 1. Comparison of two methods of calculation for free T_4 before the change of antibody.

FT₄oc = original method of calculation;
FT₄nc = modified method of calculation;
FT₄oc = 1.141 · FT₄nc - 5.019;
FT₄nc = 0.809 · FT₄oc + 5.633; N = 145; r = 0.961.

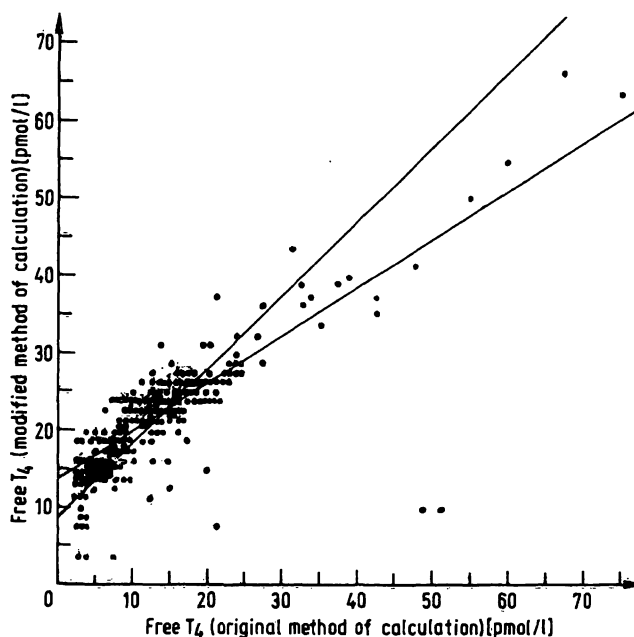


Fig. 2. Comparison of two methods of calculation for free T_4 after the change of antibody.

FT₄oc = original method of calculation;
FT₄nc = modified method of calculation;
FT₄oc = 1.046 · FT₄nc - 9.212;
FT₄nc = 0.615 · FT₄oc + 13.686; N = 225; r = 0.802.

These reference values were calculated both for a group of blood donors and a group of selected euthyroid patients, who fulfil the following criteria:

— they have never been treated for any kind of thyroid dysfunction.

- they are not using any drug known to influence thyroid function, concentration of T_4 -binding proteins or interaction between T_4 and its binding proteins.

The 95% interval for both control groups and the reference values based on these two populations are shown in table 2.

Tab. 2. The 95% interval for free T_4 (in pmol/l) in two euthyroid control groups and the reference values based on both groups. Free T_4 is calculated by both methods of calculation (FT_{4oc} = original method of calculation and FT_{4nc} = modified method of calculation), before and after the change of antibody.

Anti-body	Method of calculation	Free thyroxine Blood donors	Selected euthyroid patients	Reference values
Original	FT_{4oc}	10.3–23.1 (N = 88)	10.3–25.7 (N = 67)	10.3–24.4
	FT_{4nc}	15.4–23.1 (N = 88)	15.4–27.0 (N = 67)	15.4–25.7
Changed	FT_{4oc}	7.4–22.4 (N = 157)	5.2–21.9 (N = 72)	7.4–22.4*)
	FT_{4nc}	16.2–28.6 (N = 157)	15.4–29.9 (N = 72)	15.4–28.6

*) This reference value is based on the blood donors only; otherwise the lower limit would be lower than the lowest standard.

Clinical significance of the "assay data" of both methods of calculation for free T_4

The patients were divided on clinical criteria into one of the four following groups:

1. Clinically euthyroid. This group included patients using drugs known to influence thyroid function and the concentration of T_4 -binding proteins.
2. Clinically hyperthyroid.
3. Clinically hypothyroid.
4. Hypothyroid patients who became euthyroid after adequate substitution therapy.
In all these patients thyrotropin levels had returned to normal, which was considered as biochemical evidence for adequate substitution therapy.

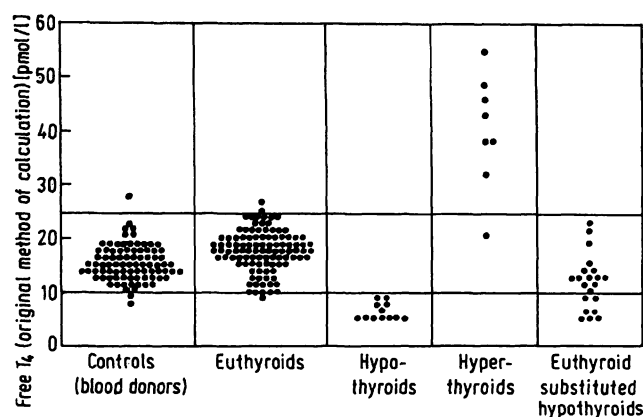


Fig. 3. Distribution of free T_4 -values, calculated by the original method, before the change of antibody.

(— = reference values)

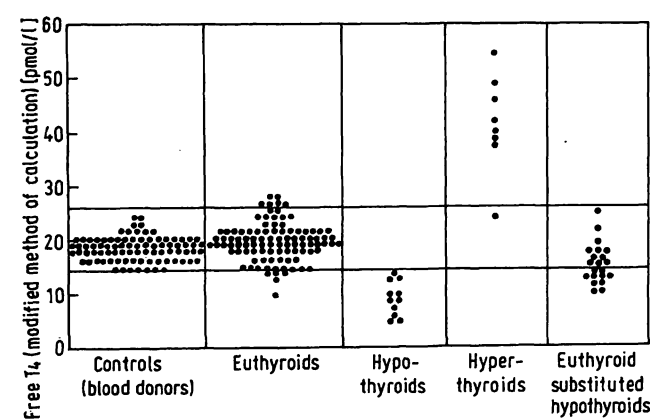


Fig. 4. Distribution of free T_4 -values, calculated by the modified method, before the change of antibody.

(— = reference values)

The two methods of calculation were compared for these four groups and a group of blood donors. The distribution of free T_4 -values before the change of antibody are shown in figure 3 and 4. After the change of antibody, a group of euthyroid pregnant women was also included in the comparison of both methods of calculation. The distribution of both free T_4 -values are shown in figure 5 and 6. The numerical agreement between clinical data and "assay data" is shown in table 3.

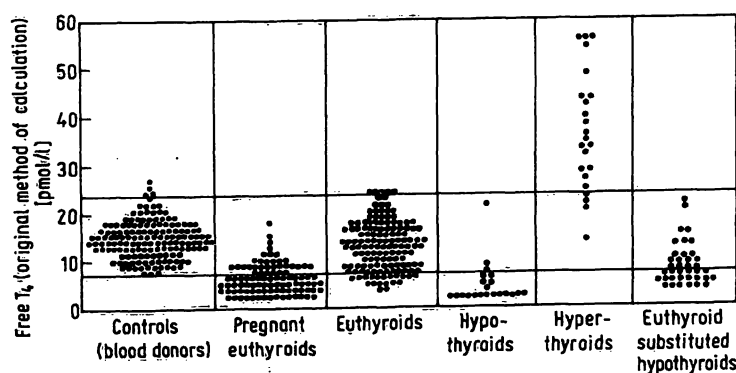


Fig. 5. Distribution of free T_4 -values, calculated by the original method, after the change of antibody.

(— = reference values)

Tab. 3. Numerical agreement of clinical data and the "assay data" of free T_4 calculated with two methods of calculation, before and after the change of antibody. (FT₄oc = original method of calculation; FT₄nc = modified method of calculation; N = number of patients).

	Original antibody			Changed antibody		
	N total	N FT ₄ oc	N FT ₄ nc	N total	N FT ₄ oc	N FT ₄ nc
- Euthyroids	104	101	93	143	118	138
- Hyperthyroids	8	7	7	23	19	22
- Hypothyroids	11	11	11	21	18	19
- Euthyroid substituted hypothyroids	21	14	11	38	18	26
All	144	133	122	225	173	205
	(100%) =	92.3%	84.7%	(100%) =	76.9%	91.1%

Discussion

Recently the method of calculation for this assay for free T_4 was discussed elsewhere (6, 7). As was pointed out on theoretical grounds, the modified method of calculation for free T_4 should be preferred. Our results

support this conclusion. In the first group of patients, before the change of antibody, the results did not differ much, but no euthyroid pregnant women could be included in this study because of the change of antibody. In the second group of patients, after the change of antibody, the modified method of calculation for free T_4 was, however, superior. This group of patients included euthyroid pregnant women. In contrast with the results of others (8, 9) our results with the Corning free T_4 kit are not influenced by abnormally elevated concentrations of T_4 -binding proteins. This is illustrated by the free T_4 results, obtained by analysis of samples of the euthyroid pregnant women (fig. 6). This difference was probably caused by the changing of antibody.

Acknowledgements

We would like to thank the following physicians, Dr. A. Bosma, Dr. J. F. Feddes, Dr. S. S. Hofstra, Dr. J. Houwerzijl, Dr. M. P. Leemhuis and Dr. J. P. Samson for providing the clinical data of their patients.

Furthermore we thank Miss L. J. Oppenheimer and Mr. J. Kattestaart for their technical assistance and Mrs. R. G. Bakker-van der Schaaf for her indispensable editorial assistance.

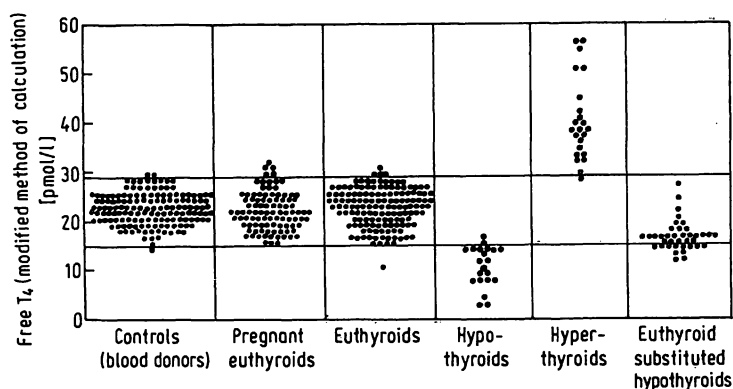


Fig. 6. Distribution of free T_4 -values, calculated by the modified method, after the change of antibody. (— = reference values)

References

- Fang, V. S. & Selenkow, H. A. (1972), *Clin. Chem.* 16, 185–190.
- McDonald L. J., Robin, N. I. & Siegel, L. (1978), *Clin. Chem.* 24, 652–656.
- Jiang, N. S. & Tue, K. A. (1977), *Clin. Chem.* 23, 1679–1683.
- Petersen, B. A., Giese, R. W., Larsen, P. R. & Kargel, B. L. (1977), *Clin. Chem.* 23, 1389–1396.
- Sachs, L. (1968), *Statistische Auswertungsmethoden*, 374–382, Springer-Verlag, Berlin.
- Ekins R. (1979), *Lancet* I, 1190–1191.
- Fullarton, J. & Lidgard, G. P. (1979), *Lancet* II, 51.
- Braverman, L. E., Abreau, C. M., Brock, P., Kleinmann, R., Fournier, L., Odstrchel, G. & Schoemaker, H. J. P. (1980), *J. Nucl. Med.* 21, 529–539.
- Witherspoon, L. R., Shuler, S. E., Garcia, M. M. & Zollinger, L. A. (1980), *J. Nucl. Med.* 21, 529–539.

Drs. A. J. Bakker
Clinical Chemistry Laboratory
Jelsumerstraat 6
NL-8917 EN Leeuwarden

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 351–356

Ein einfaches Modell zur Haltbarkeitsberechnung

Von P. Schlöpfer und F. Hänni

F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(Eingegangen am 18. März 1980/9. Februar 1981)

Zusammenfassung: Mit Hilfe eines einfachen Modells wird die Haltbarkeitsberechnung unter Berücksichtigung der Geschwindigkeitskonstanten und deren Streuung sowie des Gesamtanalysenfehlers bei gegebener Verlusttoleranz und Ausschußwahrscheinlichkeit aufgezeigt. An den Beispielen Kreatinkinase und saure Phosphatase als kritischen Komponenten einer Kontrollprobe wird das Verfahren näher erläutert.

A simple model for the calculation of stability

Summary: A simple model for stability calculation is demonstrated, taking into consideration the velocity constant, its variance, the analytical error by given loss tolerance and the rejection probability. The procedure is explained in detail and exemplified by creatine kinase and acid phosphatase, both relative instable components in control samples.

Einleitung

Bei der Entwicklung und Kommerzialisierung von biochemischen Produkten ist die Stabilitätsprüfung ein wichtiger Bestandteil der Qualitätssicherung. Das Spektrum der Haltbarkeitsprüfung umfaßt Streßversuche (durch thermische Belastung) (1), um kurzfristig zu einer verbindlichen Aussage zu kommen, und die Langzeitprüfung.

In Zusammenhang mit der Entwicklung von Kontrollproben zur Qualitätskontrolle im klinisch-chemischen Labor wurde nach einem allgemein anwendbaren Modell zur Haltbarkeitsberechnung gesucht. Damit sollte es möglich sein, die Stoffabnahme (selten auch eine „scheinbare Zunahme“ wie die Aktivierung von Enzymen usw.) zu umschreiben und aufgrund der experimentell bestimmten Kenngrößen (Geschwindigkeitskonstanten λ , deren Standardabweichung σ_λ , Gesamtanalysenfehler σ_{Oij}) sowie durch Vorgabe der Verlusttoleranz und der Ausschußwahrscheinlichkeit eine Mindesthaltbarkeit zu prognostizieren.

Zerfallsgesetz

Bei der Haltbarkeitsprüfung werden in einem ersten Schritt die durch Zersetzungsreaktionen hervorgerufenen stofflichen Änderungen bei vorgewählten Lagerungsbedingungen experimentell erfaßt. Aus den Stoffmen-

gen-Zeit- bzw. Konzentration-Zeit-Relationen läßt sich die Reaktionsordnung (2)

- durch die Halbwertszeit-Methode;
- nach der *Powellschen* Methode (mit dimensionslosen Parametern);
- nach der *van't Hoff'schen* Methode (Messung der Anfangsgeschwindigkeit für verschiedene Ausgangskonzentrationen);
- direkt aus den Geschwindigkeitsdaten ermitteln.

Wie wir feststellen konnten, gelingt es oft, die Konzentrationsabnahme $c(t)$ eines Wirkstoffes (über die Halbwertszeitkonzentration hinaus) durch eine Bruttoreaktion 1. Ordnung

$$c(t) = c_0 e^{-\lambda t} \quad \text{Gl. (1)}$$

wiedergzugeben (3) (cf. hierzu die Anwendungsbeispiele).

Zudem laufen die Zersetzungsreaktionen bei den zur Haltbarkeitsprüfung anstehenden Produkten meist langsam ab und erreichen im beobachteten Zeitraum selten eine Abnahme von > 20%. Damit läßt sich auch bei komplexen Reaktionssystemen (Folgereaktionen u. a.) die Stoffänderung durch Gl. (1) genügend genau erfassen. Die weiteren Betrachtungen basieren aus diesen Gründen auf der Gültigkeit einer Reaktion 1. Ordnung. Für die seltenen Fälle wo dies nicht zutrifft, kann unser Haltbarkeitsberechnungsmodell leicht angepaßt werden.

Definitionen

Allgemein

Die *Deklaration* c_0 entspricht dem Mittelwert der Konzentration eines Wirkstoffes zum Zeitpunkt t_0 (bei Kontrollproben würde dies dem Sollwert eines bestimmten Bestandteils entsprechen).

Als *Verlusttoleranz* α bezeichnen wir den Anteil, um welchen die Konzentration des Wirkstoffes höchstens abnehmen darf. Das Festlegen der Verlusttoleranz obliegt dem Hersteller, sofern nicht vom Gesetzgeber entsprechende Verordnungen vorliegen.

Die *prognostizierte Haltbarkeit* entspricht der berechneten Verfallzeit t_p , in welcher ein Anteil β (*Ausschufswahrscheinlichkeit*) von Meßwerten für die Konzentration der instabilsten Komponente unter den *Grenzwert* c_m fällt. Es gilt definitionsgemäß:

$$c_m = (1 - \alpha) c_0 \quad \text{Gl. (2)}$$

Meßwerte, abgeleitete und statistische Größen

t_k : Zeit der k-ten Messung; $k = 0 \dots \infty$

c_{kij} : Konzentration der Messung j ; $j = 1, 2 \dots m$ der Stichprobe i ; $i = 1, 2 \dots n$, zur Zeit t_k

\bar{c}_{ki} : Mittelwert der gemessenen Konzentrationen der Stichprobe i zur Zeit t_k

c_{ki} : wahrer Wert von \bar{c}_{ki}

\bar{c}_k : Mittelwert der gemessenen Konzentrationen aller Stichproben zur Zeit t_k

c_k : wahrer Wert von \bar{c}_k

σ : wahre Standardabweichung

σ_{kij} : Standardabweichung der Einzelmessungen c_{kij} um c_k

σ_{ki} : Standardabweichung des Mittelwerts \bar{c}_{ki} um c_k

σ_a : Standardabweichung der Analyse

σ_{0ij} : Gesamtanalysenfehler (d.h. Standardabweichung der Chargenvariabilität und Analyse)

s : beste Schätzung der Standardabweichung

κ : einseitige Signifikanzschranke der standardisierten Normalverteilung für β (vgl. l.c. (4)).

Mathematische Abkürzungen

Die Mittelwertbildung wird folgendermaßen vereinfacht dargestellt:

$$\bar{c}_{kij} = \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n \frac{1}{m} \left(\sum_{j=1}^m c_{kij} \right) \right].$$

Für die Aussage, daß \bar{c}_{ki} der Schätzwert von c_{ki} ist, gilt die Darstellung $c_{ki} \Leftarrow \bar{c}_{ki}$.

Annahmen über die Verteilungsfunktionen

Wie eingehende Vorversuche gezeigt haben, dürfen unter Berücksichtigung der in der Einleitung und unter Anwendungsbeispiele getroffenen Feststellungen folgende Annahmen getroffen werden:

a) Normalverteilung der Wirkstoffanfangskonzentrationen c_{0i} in der Stichprobe i um den Mittelwert c_0 (Deklaration) mit der Standardabweichung σ_0 .

b) Normalverteilung der relativen Analysenfehler δ_a um den Mittelwert 0 mit der Standardabweichung σ_a .

c) Normalverteilung der Geschwindigkeitskonstanten λ_i in der Stichprobe i um den Mittelwert λ mit der Standardabweichung σ_λ .

d) Die Standardabweichungen σ_0 und σ_a sowie σ_λ sind statistisch unabhängig.

e) Änderung der Wirkstoffkonzentration mit der Zeit gemäß Gl. (1).

Berechnung der Haltbarkeit

Die zur Lösung wichtigen Zusammenhänge sind in Abbildung 1 dargestellt.

Zum Zeitpunkt t_0 (wird im folgenden immer Null gesetzt) sind die wahren Konzentrationen der Stichproben um den Mittelwert c_0 der Charge verteilt. Die Konzentrationen der Stichproben und damit der Mittelwert nehmen mit der Zeit ab. Würden im Zeitpunkt t_p Messungen durchgeführt, so wären die Meßwerte um c_p mit der Standardabweichung $\sigma_{p ij}$ näherungsweise normalverteilt (vgl. Anhang). $\sigma_{p ij}$ hängt von den Standardabweichungen der Stichproben, der Geschwindigkeitskonstanten und den Meßfehlern ab. Ein Anteil β von Meßwerten liegt dann unterhalb ($c_p - \kappa \sigma_{p ij}$). Setzt man diesen Wert gleich dem Grenzwert c_m , so folgt

$$c_p - \kappa \sigma_{p ij} = c_m = (1 - \alpha) c_0. \quad \text{Gl. (3)}$$

Auf die umfangreiche Herleitung der exakten Lösung wird hier verzichtet. Die Berechnungen führen zu Gleichung (4).

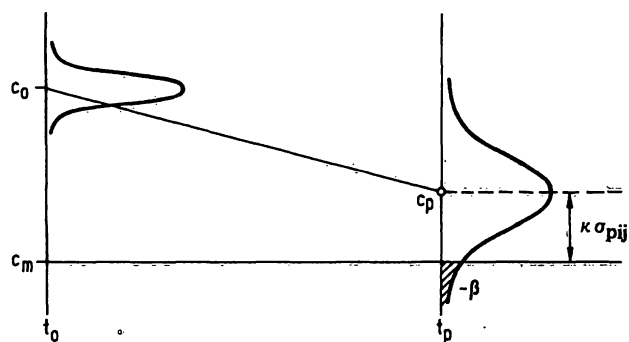


Abb. 1. Verteilungsfunktion der wahren Konzentrationen zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ (c_0) und diejenige der Messungen zum Zeitpunkt t_p (Mittelwert c_p mit Standardabweichung $\sigma_{p ij}$).

chungen mit Fehlerintegralen, die nur mit einem Digitalrechner gelöst werden können.

Vom Labor aus besteht selten ein direkter Zugriff zum Computer, und Tabellenwerke sind umständlich zu handhaben. Deshalb haben wir nach einer Näherungslösung für t_p gesucht, die sich bequem mit den üblichen, programmierbaren Kleinrechnern berechnen läßt.

Nach Einsetzen der Näherungsgleichungen für

$$c_p = c_o e^{-\lambda t_p} \quad \text{Gl. (4)}$$

und

$$\sigma_{pij}^2 = c_p^2 \left(\left(\frac{\sigma_{oij}}{c_o} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_\lambda}{\lambda} \right)^2 (\lambda t_p)^2 \right) \quad \text{Gl. (5)}$$

(vgl. Anhang Gl. (4a) und Gl. (9a) in Gl. (3), sowie Ordnen ergibt sich:

$$\lambda t_p = \ln \frac{1 - \kappa \sqrt{\left(\frac{\sigma_{oij}}{c_o} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_\lambda}{\lambda} \right)^2 (\lambda t_p)^2}}{1 - \alpha} \quad \text{Gl. (6)}$$

Für $\sigma_\lambda = 0$ wird damit eine explizite Lösung für die Verfallzeit t_p erhalten. Im allgemeinen Fall $\sigma_\lambda > 0$ läßt sich t_p durch ein Iterationsverfahren einfach berechnen. Bei allen sinnvollen Anwendungen weicht α wenig von 0 ab (gleichbedeutend mit $\lambda t_p \ll 1$).

Die Resultate für viele Parameterkombinationen wurden mit den Ergebnissen eines Computerprogrammes für die exakte Lösung verglichen und Übereinstimmung auf mindestens drei signifikante Ziffern festgestellt.

Bestimmung von c_o und s_o der Charge

Aus den Meßwerten c_{oij} von mehreren Messungen j an mehreren Stichproben i einer Charge zur Zeit t_o , können c_o und σ_o bzw. s_o wie folgt bestimmt werden:

$$c_{oi} = \bar{c}_{oi} = \bar{j} \bar{c}_{oij} \quad \text{Gl. (7)}$$

$$c_o = \bar{c}_o = \bar{i} \bar{c}_{oi} \quad \text{Gl. (8)}$$

$$\sigma_o^2 = s_o^2 = \bar{i} (\bar{c}_{oi} - c_o)^2 \quad \text{Gl. (9)}$$

wobei es zu beachten gilt:

$$\sigma_a^2 = \bar{i, j} \left(\frac{c_{oij} - c_{oi}}{c_{oi}} \right)^2 \quad \text{Gl. (10)}$$

$$\sigma_{oij}^2 = \bar{i, j} (c_{oij} - c_o)^2 = \sigma_{oi}^2 + (c_o \cdot \sigma_a)^2 \quad \text{Gl. (11)}$$

Bestimmung von λ und s_λ des Wirkstoffes

Aus den Meßwerten c_{kij} von mehreren Messungen j an mehreren Stichproben i , bei den Zeitpunkten t_k , können λ und σ_λ bzw. s_λ wie folgt bestimmt werden:

$$\bar{c}_{ki} = \bar{j} \bar{c}_{kij} \quad \text{Gl. (12)}$$

$$\lambda_i = \text{REGR} [\ln(c_{ki}), t_k] \quad \text{Gl. (13)}$$

$$\lambda = \bar{\lambda} = \bar{i} \bar{\lambda}_i \quad \text{Gl. (14)}$$

$$\sigma_\lambda = s_\lambda^2 = \bar{i} (\bar{\lambda}_i - \lambda)^2 \quad \text{Gl. (15)}$$

REGR: Orthogonale lineare Regression

Rechenprogramm

Zur Berechnung der Verfallzeit t_p nach Gleichung (6) wurde ein Rechenprogramm für die Kleinrechner HP-67/97¹⁾ geschrieben. Dabei wurde berücksichtigt, daß in seltenen Fällen während der Lagerdauer eine „scheinbare Gehaltszunahme“ der Wirkstoffe (z.B. Aktivierung der alkalischen Phosphatase EC 3.1.3.1) eintreten kann. In diesem Fall sind α und λ negativ einzugeben. Das Rechenprogramm enthält neben der Iteration einen von uns neu entwickelten, konvergenzbeschleunigenden Schritt über eine geometrische Reihe.

Anwendungsbeispiele

Als Beispiele zur Berechnung der Haltbarkeit werden die Kreatinkinase (EC 2.7.3.2) und saure Phosphatase (EC 3.1.3.2) als kritische Bestandteile einer Kontrollprobe herangezogen. Damit das Datenmaterial nicht zu umfangreich wird, sind nur die Meßresultate einer Charge angegeben, obgleich mehrere Chargen überprüft worden sind.

Analysenmethoden

Kreatinkinase wurde nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (5, 6) (mit N-Acetylcystein als Aktivator) auf dem ABA-100²⁾ mit Automatenpackung Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 126357 und entsprechender Arbeitsanleitung bestimmt.

Saure Phosphatase wurde mit Thymolphthaleinmonophosphat als Substrat auf dem Greiner Selective Analyzer GSA II³⁾ nach Arbeitsanleitung C SP1 (7) bestimmt.

Bestimmung von λ , σ_λ

Dazu wurden für jede Meßtemperatur (25 °C, 30 °C, 37 °C) je 10 Fläschchen einer lyophilisierten Kontrollprobe, mit bidest. Wasser nach Vorschrift aufgelöst, verwendet.

Bestimmung von σ_{oij}

Von derselben Kontrollprobe wurden zusätzlich 10 Fläschchen eingesetzt.

1) Hersteller: Hewlett-Packard S.A., CH-1217 Meyrin. Die Programmbeschreibung kann bei den Autoren angefordert werden.

2) Hersteller: Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Pasadena, CA 91030, USA.

3) Hersteller: Greiner Electronics AG, CH-4900 Langenthal.

Die Analysenergebnisse sind in den Abbildungen 2 und 3 sowie in der Tabelle 1 enthalten.

Besser gesicherte Werte für λ zur Berechnung der Haltbarkeit können in diesem Fall aus den *Arrhenius*-Plots durch Regressionsrechnung erhalten werden.

Wie stark σ_{oij} die Verfallzeit t_p beeinflusst, sei an einem vorgegebenen Beispiel in Tabelle 2 veranschaulicht.

Man muß darauf achten, daß die Meßfehler möglichst klein bleiben, da sonst die prognostizierte Haltbarkeit durch die statistisch schlecht gesicherten Parameter stark herabgesetzt wird. Dies läßt sich durch die mechanisierte Durchführung spezifischer Analysenmethoden (möglichst zur Erfassung des intakten Wirkstoffes und Mehrfachbestimmungen) erreichen. Während der Stabilitätsprüfung

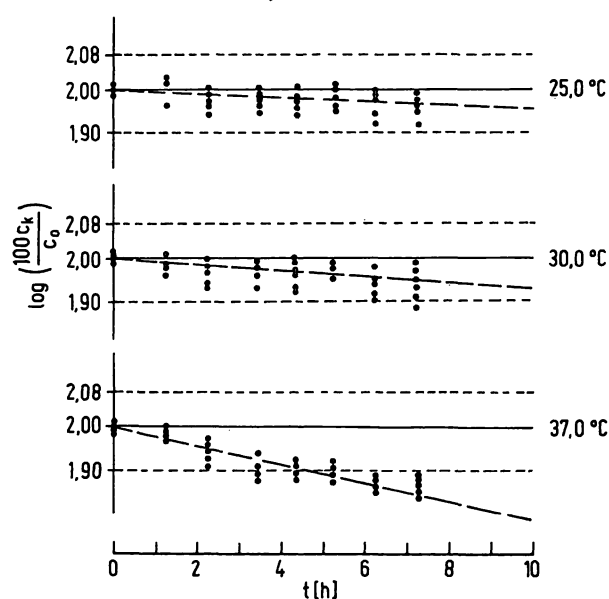


Abb. 2. Konzentration-Zeit-Diagramm: Kreatinkinase als Bestandteil einer Kontrollprobe.

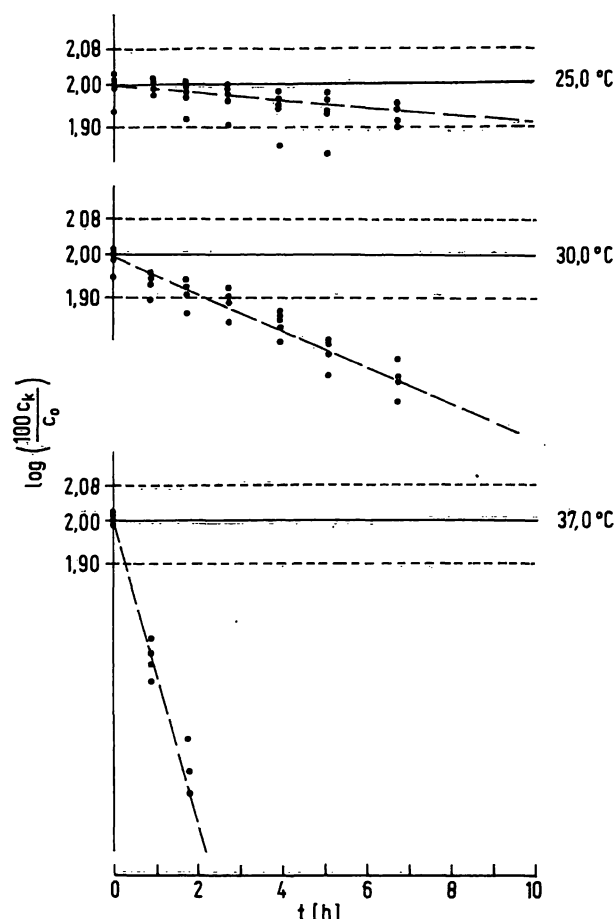


Abb. 3. Konzentration-Zeit-Diagramm: Saure Phosphatase als Bestandteil einer Kontrollprobe.

ist die einmal gewählte Methode unbedingt beizubehalten.

Die prognostizierte Haltbarkeit kann nach Ablauf durch Kontrollmessungen (vgl. hierzu i. c. (8)) überprüft werden, wobei höchstens ein Bruchteil β einen Verlust von mehr als α haben darf.

Tab. 1. Aus den Einzelergebnissen berechnete Gesamtanalysenfehler σ_{oij}/c_o , Geschwindigkeitskonstanten λ und deren Standardabweichung σ_λ sowie die daraus resultierenden Haltbarkeiten t_p für
a) λ einzeln bestimmt (Abb. 2 & 3),
b) λ nach Ausgleichsrechnung bestimmt (Abb. 4 & 5);
Verlusttoleranz $\alpha = 0,2$ und Ausschlußwahrscheinlichkeit $\beta = 0,05$.

Bestandteil	Meßtemperatur (°C)	σ_{oij}/c_o (%)	σ_λ (h ⁻¹)	λ (h ⁻¹)	t_p (h)	λ (h ⁻¹)	t_p (h)
Kreatinkinase	25,0	4,2	0,00235	0,00992	13,4	0,00954	13,8
	30,0	5,3	0,00346	0,01790	6,9	0,01914	6,4
	37,0	3,3	0,00239	0,04945	3,4	0,04803	3,4
Saure Phosphatase	25,0	3,0	0,00438	0,01895	7,7	0,02061	7,2
	30,0	2,5	0,02356	0,11192	1,4	0,09654	1,5
	37,0	1,5	0,03639	0,69704	0,3	0,74284	0,3
					a)	b)	

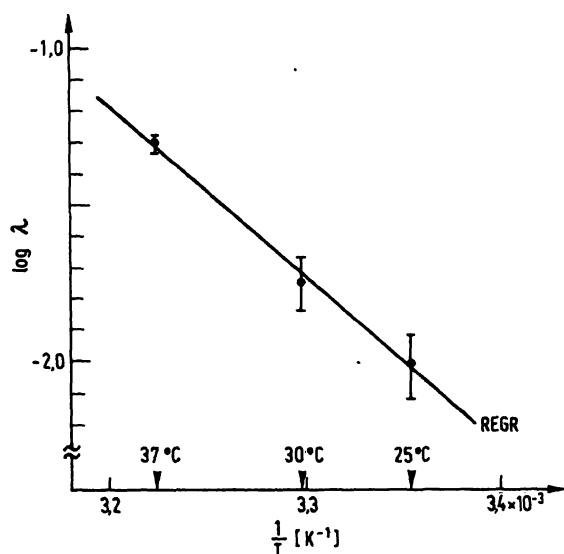


Abb. 4. Arrhenius-Plot: Kreatinkinase als Bestandteil einer Kontrollprobe. Mittelwert $\log \lambda \pm 1s$ angegeben.

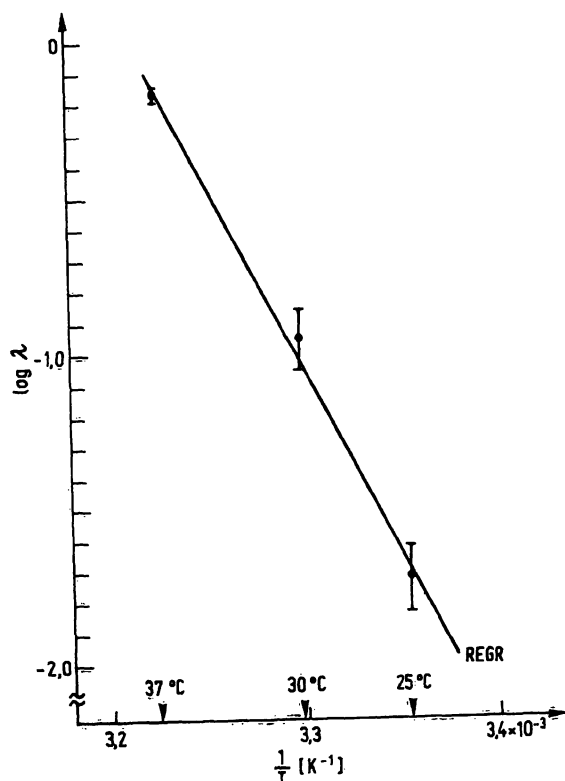


Abb. 5. Arrhenius-Plot: Saure Phosphatase als Bestandteil einer Kontrollprobe. Mittelwert $\log \lambda \pm 1s$ angegeben.

Tab. 2. Einfluß der Standardabweichungen σ_λ und σ_{oij}/c_o auf die Haltbarkeit.

Anfangsbedingungen:

Geschwindigkeitskonstante $\lambda = 10^{-4} \text{ h}^{-1}$; Verlusttoleranz α und Ausschlußwahrscheinlichkeit $\beta = 0,05$.

σ_λ (h^{-1})	σ_{oij}/c_o (%)	0	1	2	3	4
0		512,9	347,1	178,4	6,90	—
10^{-5}		440,3	338,0	177,2	6,90	—
$2 \cdot 10^{-5}$		385,4	317,1	173,6	6,90	—
$3 \cdot 10^{-5}$		342,5	293,0	168,3	6,89	—
$4 \cdot 10^{-5}$		308,1	270,0	162,0	6,88	—
$5 \cdot 10^{-5}$		280,0	249,3	155,0	6,87	—
$6 \cdot 10^{-5}$		256,5	231,0	148,0	6,85	—

Anhang

Näherungslösung für c_p

Für die Konzentrationen einer Stichprobe i zum Zeitpunkt t_p erhält man mit den Abweichungen:

$$\epsilon_{oi} = c_{oi} - c_o \quad \text{Gl. (1aa)}$$

$$\epsilon_{\lambda i} = \lambda_i - \lambda \quad \text{Gl. (1ab)}$$

$$\delta_{aij} = (c_{oij} - c_{oi})/c_{oi} \quad \text{Gl. (1ac)}$$

als Meßwert

$$c_{pij} = (c_o + \epsilon_{oi}) (1 + \delta_{aij}) e^{-(\lambda + \epsilon_{\lambda i}) t_p} \quad \text{Gl. (2a)}$$

Durch Entwicklung nach ϵ_{oi} , δ_{aij} und $\epsilon_{\lambda i}$ und Abbruch nach den Gliedern 1. Ordnung ergibt sich:

$$c_{pij} = c_o e^{-\lambda t_p} \left(1 + \frac{\epsilon_{oi}}{c_o} + \delta_{aij} - \epsilon_{\lambda i} t_p \right) \quad \text{Gl. (3a)}$$

Durch Mittelwertbildung über j und i folgt für die Abnahme des Mittelwertes:

$$c_p = c_o e^{-\lambda t_p} \quad \text{Gl. (4a)}$$

Näherungslösung für σ_{pij}

Für die Standardabweichung σ_{pij} der Meßwerte zur Zeit t_p gilt:

$$\sigma_{pij}^2 = \frac{c_{pij}}{(c_{pij} - c_p)^2} \quad \text{Gl. (5a)}$$

mit

$$c_{pij} - c_p = c_p \left(\frac{\epsilon_{oi}}{c_o} + \delta_{aij} - \epsilon_{\lambda i} t_p \right) \quad \text{Gl. (6a)}$$

Aus Gleichung (5a) und (6a) folgt

$$\sigma_{pij}^2 = c_p^2 \left(\left(\frac{\sigma_o}{c_o} \right)^2 + \sigma_a^2 + \left(\frac{\sigma_\lambda}{\lambda} \right)^2 (\lambda t_p)^2 \right) \quad \text{Gl. (7a)}$$

und analog für die Zeit t_o

$$\sigma_{oi}^2 = \sigma_o^2 + c_o^2 \sigma_a^2 \quad \text{Gl. (8a)}$$

Damit läßt sich Gleichung (7a) weiter vereinfachen zu

$$\sigma_{pij}^2 = c_p^2 \left(\left(\frac{\sigma_{oij}}{c_o} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_\lambda}{\lambda} \right)^2 (\lambda t_p)^2 \right) \quad \text{Gl. (9a)}$$

Literatur

1. Grimm, W. (1973), *Pharm. Ind.* 35, 79–85.
2. Frost, A. A. & Pearson, R. G. (1973), *Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen*, 2. Aufl., Kap. 2 & 3, Verlag Chemie, Weinheim.
3. Grimm, W. (1974), *Pharm. Ind.* 36, 437–442.
4. *Wissenschaftliche Tabellen Geigy* (1980), Teilband Statistik, 8. Auflage, S. 26, Ciba-Geigy AG, Basel.
5. *Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für klinische Chemie:* (1977), *diese Z.* 15, 249–254.
6. Gruber, W. (1978), *Clin. Chem.* 24, 177–178.
7. *Methods Handbook* (1976), Greiner Electronics Selective Analyzer GSA II.
8. Thiers, R. E., Wu, G. T., Reed, A. H. & Oliver, L. K. (1976), *Clin. Chem.* 22, 176–183.

Dipl. Chem. P. Schlöpfer und Dr. F. Hänni
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
CH-4002 Basel